

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 2004236516
PUBLICATION DATE : 26-08-04

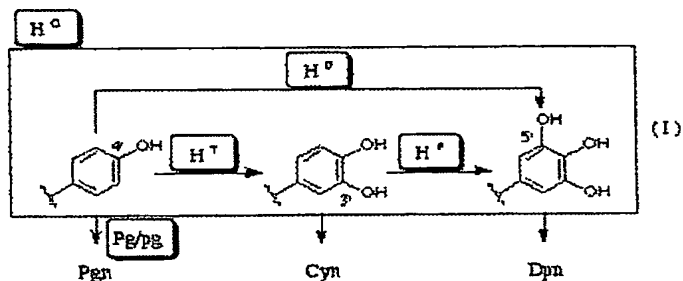
APPLICATION DATE : 04-02-03
APPLICATION NUMBER : 2003026598

APPLICANT : SAKATA YUSUKE;

INVENTOR : SAKATA YUSUKE;

INT.CL. : A01H 1/02

TITLE : METHOD FOR FLOWER COLOR
GENOTYPE CROSSING OF EUSTOMA
OR LISIANTHUS



ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To elucidate inheritance of flower pigment biosynthesis and elucidate the flower color inheritance and pigment genotype of Eustoma or Lisianthus, and further to provide a practical method for genotype crossing for creating a new flower color of petals including the Eustoma or Lisianthus.

SOLUTION: This method for flower color genotype crossing comprises the following. A new law that the flower color genotype is involved in flavonoid biosynthesis of a pathway formula (I) and inheritance of flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) or flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3',5'H) is controlled with four multiple alleles is found out. From the results, the flower color can freely be created from the pigment genotype of the Eustoma or Lisianthus even without using a method for causing mutation by genetic recombination, irradiation, or the like. Thereby, the new flower color can be created.

COPYRIGHT: (C)2004,JPO&NCIPI

METHOD FOR FLOWER COLOR GENOTYPE CROSSING OF EUSTOMA OR LISIANTHUS

Publication number: JP2004236516
Publication date: 2004-08-26
Inventor: HASHIMOTO FUMIO; SAKATA YUSUKE
Applicant: HASHIMOTO FUMIO; SAKATA YUSUKE
Classification:
- **International:** A01H1/02; A01H1/02; (IPC1-7): A01H1/02
- **European:**
Application number: JP20030026598 20030204
Priority number(s): JP20030026598 20030204

Report a data error here

Abstract of JP2004236516

PROBLEM TO BE SOLVED: To elucidate inheritance of flower pigment biosynthesis and elucidate the flower color inheritance and pigment genotype of Eustoma or Lisianthus, and further to provide a practical method for genotype crossing for creating a new flower color of petals including the Eustoma or Lisianthus.

SOLUTION: This method for flower color genotype crossing comprises the following. A new law that the flower color genotype is involved in flavonoid biosynthesis of a pathway formula (I) and inheritance of flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) or flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3',5'H) is controlled with four multiple alleles is found out. From the results, the flower color can freely be created from the pigment genotype of the Eustoma or Lisianthus even without using a method for causing mutation by genetic recombination, irradiation, or the like. Thereby, the new flower color can be created.

COPYRIGHT: (C)2004,JPO&NCIP

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-236516

(P2004-236516A)

(43) 公開日 平成16年8月26日(2004.8.26)

(51) Int.Cl.⁷

A01H 1/02

F1

A01H 1/02

テーマコード(参考)

2B030

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願2003-26598 (P2003-26598)

(22) 出願日 平成15年2月4日(2003.2.4)

特許法第30条第1項適用申請有り 2002年8月1
1日~17日 開催の「XXVth Interna
tional Horticultural Cong
ress」において文書をもって発表

(71) 出願人 302068210

橋本 文雄

鹿児島県鹿児島市唐湊三丁目31-1-2
-6

(71) 出願人 302068209

坂田 祐介

鹿児島県鹿児島市谷山中央四丁目4919
番地A303

(72) 発明者 橋本 文雄

鹿児島市唐湊三丁目31-1-2-6

(72) 発明者 坂田 祐介

鹿児島市谷山中央四丁目4919番地A3
03

Fターム(参考) 2B030 AA02 AB03 AD12 CA01

(54) 【発明の名称】 トルコギキョウの花色遺伝型交配法

(57) 【要約】

【課題】 花色素生合成の遺伝を明らかにし、トルコギキョウの花色遺伝と色素遺伝型を明らかにした上で、トルコギキョウを初めとする花卉の新花色作出について実用的遺伝型交配法を提供するものである。

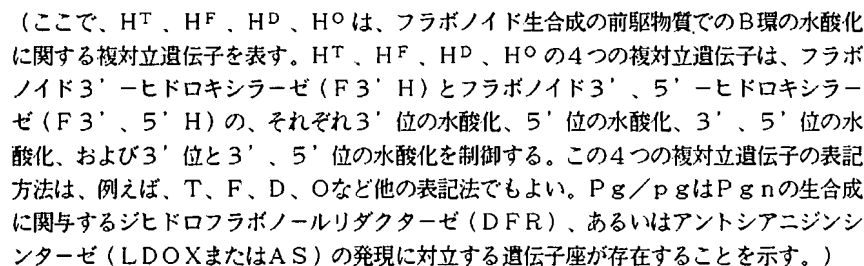
【解決手段】 本発明の花色遺伝型交配法は、花色遺伝型が経路式(I)のフラボノイド生合成に関与し、フラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ(F3'H)やフラボノイド3'、5'-ヒドロキシラーゼ(F3'、5'H)の遺伝が四つの複対立遺伝子によって制御されているという新しい法則を見出し、結果として、遺伝子組み替え、照射などによる突然変異を起こさせる方法を用いなくても、トルコギキョウの色素遺伝型からその花色を自由に創成できる、新花色を作出する方法である。〔化1〕

【選択図】 なし

【讀求項1】

【請求項2】

【化1】



【請求項3】

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】

【0002】

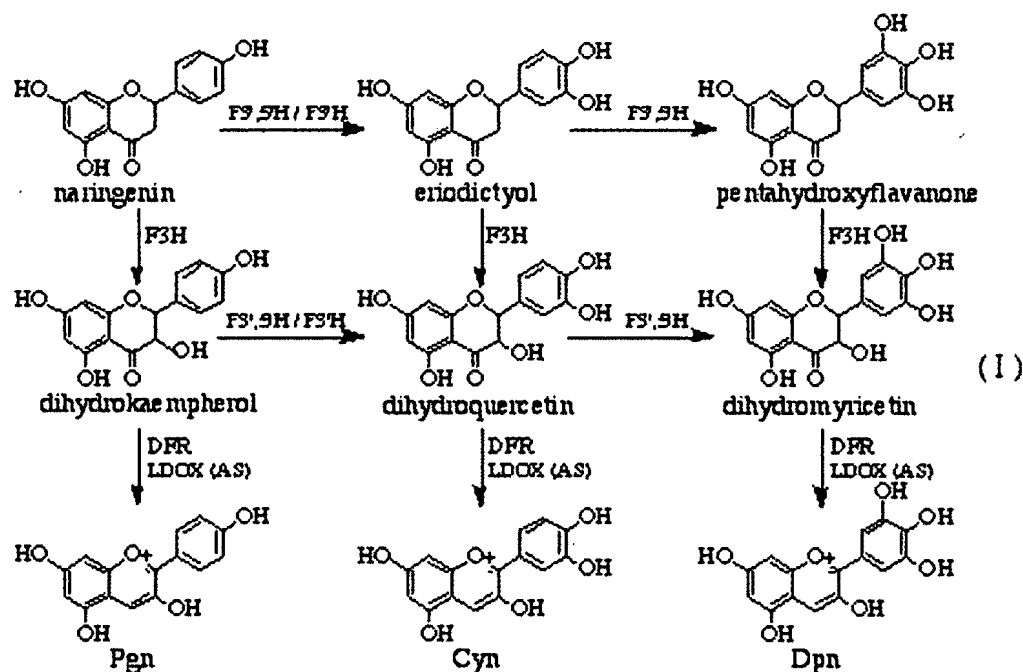
【従来の技術】

【0003】

アントシアニン類は、植物の花において、フラバノンであるナリンゲニン (naringenin) を出発物質として生合成される。即ち、まずフラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ (F3', 5'-HまたはF3'H) の作用によりフラバノン骨格のB環に水酸基が更に1個結合したエリオディクチオール (eriodictyol)、更に2個結合した

ペンタヒドロキシフラバノン (pentahydroxyflavanone) へ酵素変換されることが知られている。また、出発物質であるナリンゲニンが、フラボノイド3-ヒドロキシラーゼ (F3H) の作用を受けジヒドロケンフェロール (dihydrokaempferol) へ酵素変換され、これが基質となって、更にフラボノイド3'-ヒドロキシラーゼの作用を受け、B環に水酸基が更に1個結合したジヒドロクエルセチン (dihydroquercetin)、更に2個結合したジヒドロミリセチン (dihydromyricetin) へ酵素変換されることが知られている。この3種のジヒドロフラボノール (dihydrokaempferol, dihydroquercetin, dihydromyricetin) がジヒドロフラボノールリダクターゼ (DFR) およびアントシアニンシンターゼ (LDOXまたはAS) の作用を受けて、それぞれペラルゴニン (Pgn)、シアニン (Cyn)、デルフィニン (Dpn) へ酵素変換されることが知られている (非特許文献2、村上孝夫：天然物の構造と化学、廣川書店、1984年9月：155-185)。この一般生成経路を一般経路式 (I) で示す。

【化2】



【0004】

アントシアニン類は、B環の水酸基が異なることでその呈色が決定される。例えば、一般に花色素で化学構造中、B環の4'位に水酸基が一個有るものはペラルゴニン (Pgn) でオレンジ色～朱赤色を呈し、B環の3'、4'位に水酸基が二個有るものはシアニン (Cyn) で赤色～深紅色を呈し、B環の3'、4'、5'位に水酸基が三個有るものはデルフィニン (Dpn) で赤紫色～紫色を呈し、これらが共存することによって様々な花色を発現する (非特許文献3、本多利雄他：現代化学、1998年5月：25-32)。

【0005】

これらの他、種々のアシル基の結合したアントシアニン類も多数報告され、これらが分子間で互いにスタッキングして花色が変調する現象 (分子間自己会合作用)、他の黄色フラボノイド類とサンドイッチ状にスタッキングして花色が変調 (青色化) する現象 (分子間コピグメント作用)、金属原子と結合することによって花色が変調 (青色化) する現象 (金属錯体イオン形成作用)、分子中のアシル基等が分子内でスタッキングして花色が変調 (青色化) する現象 (分子内コピグメント作用)、並びに細胞液胞内pHが変化する現象などで花色が決定されることが認められている (非特許文献4、Goto, T. et al. : Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 30:17-33, 1991)。

)。

【0006】

植物の花色遺伝は、花色自体(赤、青、黄、紫など)を遺伝子型として捉えたものが多く報告されている(非特許文献5、安田 齊:花色の生理・生化学、内田老鶴園:pp 219-272)。近年、フラボノイド色素に関する花色遺伝型の解析が試みられているが、これらはビール(Beale、1945)の唱えた1遺伝子1酵素説に基づくものである。その例として、ゼラニウム花卉のアントシアニン生合成における、ジヒドロフラボノールリダクターゼ(DFR)およびアントシアニンシンターゼ(LDOXまたはAS)の酵素系をそれぞれ E_1/e_1 および E_2/e_2 と表記し、遺伝子型を想定した方法がある(非特許文献6、小林加奈:育種学雑誌、48:169-176、1998)。

【0007】

また、ペチュニアの花では、 Ht_1 と Ht_2 の2遺伝子がフラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ($F3'H$)を、 Hf_1 と Hf_2 の2遺伝子がフラボノイド3'、5'-ヒドロキシラーゼ($F3'$ 、 $5'H$)を制御すると報告されている(非特許文献7、Holton、T. A. et al.:The Plant Cell、7:1071-1083、1995)。

【0008】

更に、ペチュニアの花では、フラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ($F3'H$)とフラボノイド3'、5'-ヒドロキシラーゼ($F3'$ 、 $5'H$)のB環の水酸化が二遺伝子支配を受けているとの記載がある(非特許文献8、Holton、T. A. et al.:Nature、366:276-279)。本発明による花色遺伝型交配法では、一遺伝子の支配下にある四つの複対立遺伝子で花色が制御されていることが特徴で、トルコギキョウの花色色素遺伝は、二遺伝子支配としては同定できなかった。

【0009】

更にまた、ペチュニアの花では、遺伝子レベルでそれぞれの2遺伝子座が(Ht_1 、 Ht_2 はフラボノイドB環の3'位の水酸化に関与し、 Hf_1 、 Hf_2 はフラボノイドB環の5'位の水酸化に)関与する事実を明らかにしたものの、色素遺伝型として後代にどのような花色が遺伝するのか、必ずしも色素遺伝型と花色の遺伝に相関性が認められなかったなどの問題点がある(非特許文献9、Griesbach、R. J.:J. Heredit、87:241-245、1996)。

【0010】

その他、特開平5-184370号(以下、特許文献1という)に、フラボノイド水酸化酵素遺伝子(特許文献1の第0001~0002段落)の記載がある。「フラボノイド3'、5'-水酸化酵素活性を持つタンパク質をコードしているDNA鎖またはこのDNA鎖の任意の断片が提供される。このDNA鎖を目的植物に導入することにより、新しい色彩を有した品種を作出することができる。また本発明は、上記のDNA鎖またはこのDNA鎖の任意の断片を含有している組換えベクターにも関する」という記載がある(特許文献1の第0004段落)。特開平10-113184号(以下、特許文献2という)には、フラボノイド配糖化酵素遺伝子(特許文献2の第0001~0008段落)の記載がある。「リンドウの花弁よりUDP-グルコース:フラボノイド3、5-O-グルコシルトランスフェラーゼ遺伝子を単離し、その配列決定をすることに成功し」、「ゲンチオデルフィン生合成遺伝子のうち、3位、5位の2位を配糖化する糖転移酵素遺伝子を提供することにある。」という記載がある(特許文献2の第0005段落)。

特開平11-509733号(以下、特許文献3という)には、植物における遺伝子発現調節のための組成物及び方法に関する特許請求の範囲1~15の記載がある。

【0011】

【特許文献1】

特開平5-184370号公報(第2頁、第14頁、図2)

【特許文献2】

特開平10-113184号公報(第2頁)

【特許文献3】

特開平11-509733号公報(第2頁)

【非特許文献1】

村上孝夫、「アントシアニン誘導体」、天然物の構造と化学、廣川書店、1984年9月、P. 170-172。

【非特許文献2】

村上孝夫、「フラボノイド」、天然物の構造と化学、廣川書店、1984年9月、P. 155-185。

【非特許文献3】

本多利雄と斉藤規夫、「花の色の科学」、現代化学、東京化学同人、1998年5月、P. 25-32。

【非特許文献4】

Goto, T. と Kondo, T.、「Structure and Molecular Stacking of Anthocyanins- Flower Color Variation」、Angew. Chem. Int. Ed. Engl.、1991年、第30巻、P. 17-33。

【非特許文献5】

安田 齊、「花色の遺伝生化学」、花色の生理・生化学、内田老鶴圃、1993年3月、P. 219-272。

【非特許文献6】

小林加奈、他2名、「ゼラニウムにおける紫色花作出のための遺伝様式の解明」、育種学雑誌、1998年、第48巻、P. 169-176。

【非特許文献7】

Holton, T. A. と Cornish, E. C.、「Genetics and Biochemistry of Anthocyanin Biosynthesis」、The Plant Cell、1995年、第7巻、P. 1071-1083。

【非特許文献8】

Holton, T. A.、他9名、「Cloning and Expression of Cytochrome P450 Genes Controlling Flower Colour」、Nature、1993年、第366巻、P. 276-279。

【非特許文献9】

Griesbach, R. J.、「The Inheritance of Flower Color in *Petunia hybrida* Vilm」、J. Hered.、1996年、第87巻、P. 241-245。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、花色自体の遺伝子型育種法では後代花色の分離に曖昧なところが多く、実用化することに沢山の問題点を残した。また、非特許文献6に記載のある、 E_1/e_1 および E_2/e_2 で表されたゼラニウム花色素の遺伝についても、後代の分離比に疑問点があり、実用化には至らなかった。特許文献においては、遺伝子組み替え、照射などによる突然変異を起こさなければ、新花色を作出することができないという問題がある。

【0013】

本発明は、花色素生合成の遺伝を明らかにし、トルコギキョウの花色遺伝と色素遺伝型を明らかにした上で、トルコギキョウを初めとする花卉の新花色作出について実用的遺伝型交配法を提供するものである。

【0014】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記の課題を解決するために、フラボノイド生合成のB環の水酸化に関するフラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ(F3'H)やフラボノイド3'、5'-ヒドロ

キシラーゼ(F3', 5' H)、などの遺伝に着目し、その遺伝の分離を調べた結果、ペラルゴニン生成に関与するジヒドロフラボノールリダクターゼ(DFR)およびアントシアニンシンターゼ(LDOX またはAS)の酵素系の遺伝がPg/pgの優性/劣性の遺伝子によって制御されていることと併せて、フラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ(F3' H)やフラボノイド3', 5'-ヒドロキシラーゼ(F3', 5' H)の遺伝が四つの複対立遺伝子によって制御されているという新しい法則を見出し、結果として、遺伝子組み替え、照射などによる突然変異を起こさせる方法を用いなくても、トルコギキョウの色素遺伝型からその花色を自由に創成できる。すなわち、

【0015】

本発明は、トルコギキョウの主要花色色素である、3つのアントシアニン：ペラルゴニン(Pgn)、シアニン(Cyn)、デルフィニン(Dpn)の遺伝に着目し、自殖や正逆交雑を行い検討した結果、F₁～F₃世代の色素表現型の分離から、遺伝の新しい法則を見出した。また、PgnとDpn色素型について、PgnとDpn色素は共存せず、両者はそれぞれ単独型として認められるか、または、Cyn色素を伴うことで遺伝することを見出した。後代実生の分離とカイ二乗検定の結果、Pgn色素の遺伝にはフラボノイド生成におけるアントシアニン生成レベルでPg/pgとして示される遺伝子座が存在することを見出した。また、色素前駆体のB環の水酸化に関与するフラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ(F3' H)とフラボノイド3', 5'-ヒドロキシラーゼ(F3', 5' H)の酵素反応系には、H^T、H^F、H^D、H^Oの4つの複対立遺伝子が存在し、これらが3'位の水酸化、5'位の水酸化、3', 5'位の水酸化、および3'位と3', 5'位の水酸化を制御し、これらの組合せによって花色表現型が決定されることを見出し、本発明を完成した。

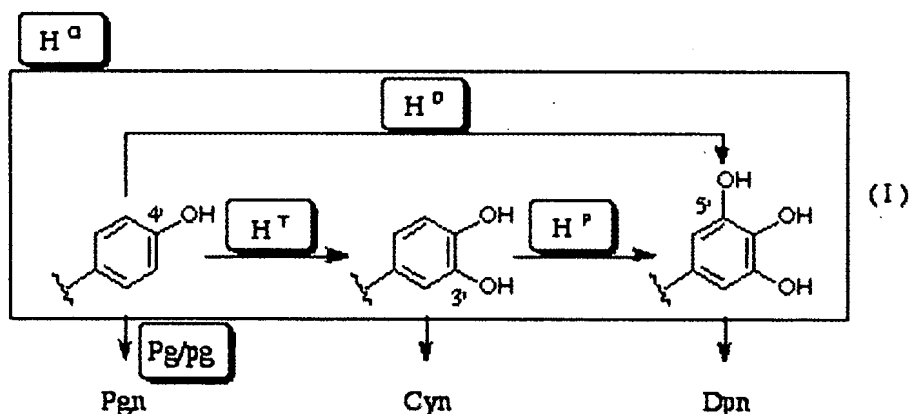
【0016】

本発明の花色遺伝型交配法は、花卉の花色発現に関わる主要アントシアニン色素のペラルゴニン(Pgn)、シアニン(Cyn)、デルフィニン(Dpn)の遺伝であって、遺伝型H^xH^x・Pg/pgを用い、新花色を作出するものである。例えば、トルコギキョウ花卉の、花色発現に関わる主要アントシアニン色素のペラルゴニン(Pgn)、シアニン(Cyn)、デルフィニン(Dpn)の遺伝について、Pgn色素の遺伝子座をPg/pgとして示し、フラボノイド色素前駆体のB環の水酸化に関与するフラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ(F3' H)とフラボノイド3', 5'-ヒドロキシラーゼ(F3', 5' H)の酵素反応系の遺伝型を、H^T、H^F、H^D、H^Oの4つの複対立遺伝子で示し、Pg/pgの記号の内二つを選択し(PgPg、Pgpg、pgpgの組合せ記号の内一つを選択し)、また、H^T、H^F、H^D、H^Oの記号の内二つを選択し(H^TH^T、H^TH^F、H^TH^D、H^TH^O、H^FH^F、H^DH^F、H^OH^F、H^DH^D、H^DH^O、H^OH^Oの組合せ記号の内一つを選択し)、遺伝型H^xH^x・Pg/pgである方法を用いた新花色を育種する花色遺伝型交配法である。

【0017】

本発明の花色遺伝型交配法は、花色遺伝型が経路式(I)のフラボノイド生成に関与し、遺伝するものも含まれる。

【化3】



ここで、 H^T 、 H^F 、 H^D 、 H^O は、フラボノイド生成の前駆物質でのB環の水酸化に関する複対立遺伝子を表す。 H^T 、 H^F 、 H^D 、 H^O の4つの複対立遺伝子は、フラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ($F3'H$)とフラボノイド3', 5'-ヒドロキシラーゼ($F3', 5'H$)の、それぞれ3'位の水酸化、5'位の水酸化、3', 5'位の水酸化、および3'位と3', 5'位の水酸化を制御する。この4つの複対立遺伝子の表記方法は、例えば、T、F、D、Oなど他の表記法でもよい。 Pg/pg はPgnの生成に関与するジヒドロフラボノールリダクターゼ(DFR)、あるいはアントシアニンシンターゼ(LDOXまたはAS)の発現に対立する遺伝子座が存在することを示す。

【0018】

本発明の花色遺伝型交配法は、花卉の花色がフラボノイド生成過程で遺伝するものに適用することができる。

【0019】

本発明の花卉とは、フラボノイドを含む花を有する被子植物であり、被子植物として双子葉植物、単子葉植物に関する。これらのうちのアントシアニンを含む花卉として、例えば、トルコギキョウ属(*Eustoma* spp)、ツバキ属(*Camellia* spp)、ツツジ属(*Rhododendron* spp)、ボタン属とシャクヤク属(*Paeonia* spp)、バラ属(*Rosa* spp)、ゼラニウム属(*Pelargonium* spp)、ペチュニア属(*Petunia* spp)、レンリソウ属(*Lathyrus* spp)などである。

【0020】

【発明の実施の形態】

本発明の花色遺伝型交配法とは、該アントシアニン類に関する遺伝型育種法であって、かつフラボノイド生成における前駆化合物のB環の水酸化に四つの複対立遺伝子で表記することのできる花色遺伝型交配法を全て含む。

【0021】

本発明において、例えば、トルコギキョウの花卉アントシアニン生成の前駆化合物生成について、複対立遺伝子の組合せが、 $H^T H^F$ 、 $H^T H^D$ と H^O -の場合、B環の水酸基が1~3個有する六種の前駆化合物(naringenin、eriodictyol、pentahydroxyflavanone、dihydrokaempferol、dihydroquercetin、dihydromyricetin)を生成し、 $H^T H^T$ の場合、B環の水酸基が1個と2個を有する四種類の前駆化合物(naringenin、eriodictyol、dihydrokaempferol、dihydroquercetin)を生成し、 $H^F H^F$ の場合、B環の水酸基を1個有する二種の前駆化合物(naringenin、dihydrokaempferol)を生成し、 $H^D H^F$ と $H^D H^D$ の場合、B環の水酸基を3個有する二種の前駆化合物(pentahydroxyflavanone、dihydromyricetin)を生成する。更に、anthocyanin synthase生成レベルにある Pg/pg の遺伝子座が存在するため、劣性ホモ型($pgpg$)を形成した場合には、前駆化合物として、ナ

リンゲニン(naringenin)およびジヒドロケンフェロール(dihydrokaempferol)を生成しても、Pgnを最終的には生成しない。他の四種の前駆化合物(eriodyctiol, pentahydroxyflavanone, dihydroquercetin, dihydromyricetin)を生成した場合には、CynおよびDpnがそのまま生成される。

【0022】

すなわち、H^Tの対立遺伝子は、ナリンゲニン(naringenin)からエリオディクティオール(eriodyctiol)およびジヒドロケンフェロール(dihydrokaempferol)からジヒドロクエルセチン(dihydroquercetin)への生化学的変換を制御し、H^Fの対立遺伝子は、エリオディクティオール(eriodyctiol)からペンタヒドロキシフラボン(pentahydroxyflavanone)およびジヒドロクエルセチン(dihydroquercetin)からジヒドロミリセチン(dihydromyricetin)への生化学的変換を制御する。従って、H^Fの対立遺伝子は、エリオディクティオール(eriodyctiol)やジヒドロクエルセチン(dihydroquercetin)の前駆化合物が存在しなければ生化学的変換は行われない。一方、H^Dの対立遺伝子は、ナリンゲニン(naringenin)からペンタヒドロキシフラボン(pentahydroxyflavanone)およびジヒドロケンフェロール(dihydrokaempferol)からジヒドロミリセチン(dihydromyricetin)への生化学的変換を制御するが、この対立遺伝子は、基質を完全にペンタヒドロキシフラボン(pentahydroxyflavanone)またはジヒドロミリセチン(dihydromyricetin)へ変換することが特徴である。

【0023】

従って、H^DH^D型とH^DH^F型の場合、Pg/pgが優性型(PgPgまたはPgpg)であっても、Pgnは生成されない。H^Oの対立遺伝子は、ナリンゲニン(naringenin)からエリオディクティオール(eriodyctiol)とペンタヒドロキシフラボン(pentahydroxyflavanone)およびジヒドロケンフェロール(dihydrokaempferol)からジヒドロクエルセチン(dihydroquercetin)とジヒドロミリセチン(dihydromyricetin)への全ての生化学的変換を制御する。H^Oの対立遺伝子は、他の三つの対立遺伝子群(H^T、H^F、H^D)に対して、調節的な役割を演じる調節遺伝子である。

【0024】

本発明において、例えば、トルコギキョウの花卉色素型について、H^TH^FPg-、H^TH^DPg-とH^O-Pg-の遺伝型でPgnCynDpn型を得ることができる。H^TH^TPg-でPgnCyn型を得ることができる。H^TH^Fpgpg、H^TH^DpgpgとH^O-pgpgでCynDpn型を得ることができる。H^FH^FPg-でPg型を得ることができる。H^TH^TpgpgでCyn型を得ることができる。H^DH^F-とH^DH^D-でDpn型を得ることができる。H^FH^Fpgpgで白花を得ることができる。ここで「白花」とは、アントシアニジンを含みない花のことを指す。なお、PgnDpn型は、実際に一度も分離しない。また、「-」と表記されているのは、その一つ前に表記された遺伝型に優性的に支配されていることを示し、いずれの遺伝型でも用いることができることを意味する。更にまた、「--」と表記されているのは、いずれの遺伝型も用いることができることを意味する。

【0025】

本発明において、例えば、トルコギキョウの花卉色素型について、PgnCynDpn型で、赤紫色、赤色、紫紫色、淡赤色、ピンク色の花を得ることができる。PgnCyn型で、赤色、深赤色、淡赤色、ピンク色の花を得ることができる。CynDpn型で、淡紫色、紫紫色、紫色、青紫色の花を得ることができる。Pgn型で、赤色、淡赤色、ピンク色、白赤色、クリーム色、白色の花を得ることができる。Cyn型で、赤色、淡赤色、ピンク色、白赤色の花を得ることができる。Dpn型で、紫色を得ることができる。Non

e型 (pgpgH^FH^F の遺伝型) で白花を得ることができる。

【0026】

【実施例】

本発明の花色遺伝型交配法は、トルコギキョウ花卉から、50%酢酸水溶液、または50%酢酸メタノールを用いてアントシアニンを抽出し(酢酸の濃度は10~50%でも可能で、酢酸の代わりに0.5~2規定塩酸を用いても良い)、これを塩酸加水分解して、アントシアニジンを含む加水分解物を高速液体クロマトグラフィー(High Performance Liquid Chromatography、HPLC)などを用いて各種アントシアニジンを分析する。自殖や交雑を繰り返して得られた後代の遺伝型について、優性ホモ型、優性ヘテロ型、劣性ホモ型を決定し、各花色をその遺伝型より様々な花色を自由自在に作出することのできる交配方法である。以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明は、これらの実施例に限定されるものではない。

【0027】

【実施例1】

トルコギキョウの花弁を採集し、全色系の花弁の着色した部分を切除し、精秤後、試験管中にて0.5~2規定塩酸水溶液(0.5~2N HCl)を加え、アントシアニン色素を抽出した。抽出液を綿栓ろ過後、ろ液について95~100℃で加熱し加水分解を行った。反応後、溶液をメンブランフィルターでろ過後、ろ液をHPLC装置にて分析した。

【0028】

分析条件および分析装置は、文献記載の方法(Uddin et al.: J. Japan. Soc. Hort. Sci., 71:40-47, 2002)を用いた。

【0029】

HPLCクロマトチャートから、3種のアントシアニジン、すなわち、それぞれのアントシアニジンのピークを占有面積として算出し、Pgn、Cyn、Dpnの全ピーク面積を100%とした。得られたピークからアントシアニジンについて、その花の色素優性型(ホモ型またはヘテロ型)を同定した。

【0030】

Dpn-主体型、Cyn-主体型およびPgn-主体型の3品種(P₁世代)を用いて、自殖によるF₂世代の分離を調べ、その結果を表1に示した。また同様に、Dpn-主体型、Cyn-主体型およびPgn-主体型の3品種(P₁世代)を用いて、正逆交雑によるF₁世代の分離を調べ、その結果を表2に示した。その結果、Dpn-主体型、Cyn-主体型またはPgn-主体型の、色素型および遺伝型を決定した。

【0031】

【表1】

P ₁ 世代 (F ₁ 品種)	P ₁ 世代 遺伝型	F ₂ アントシアニ ジンの色素型	観察値 (個体数)	F ₂ 世代 遺伝型	期待値 (分離比)	χ ² -検定値 *P<0.05	適合値
Cyn-主体型	H ^T H ^F P _g P _g	P _g nCynDpn	37	H ^T H ^F P _g -	6	8.838*	0.116
		P _g nCyn	17	H ^T H ^T P _g -	3		
		CynDpn	11	H ^T H ^F P _g P _g	2		
		P _g n	10	H ^F H ^F P _g -	3		
		Cyn	1	H ^T H ^T P _g P _g	1		
		none	2	H ^F H ^F P _g P _g	1		
		(78)					
Dpn-主体型	H ^O H ^D P _g P _g	CynDpn	31	H ^O -P _g P _g	3	0.485*	0.468
		Dpn	13 (44)	H ^D H ^D P _g P _g	1		
P _g n-主体型	H ^T H ^T P _g P _g	P _g nCyn	96 (96)	H ^T H ^T P _g P _g	1	-	1.000

【0032】

【表2】

P ₁ 世代 (F ₁ 品種)	P ₁ 世代 遺伝型	F ₁ アントシアニ ジンの色素型	観察値 (個体数)	F ₁ 世代 遺伝型	期待値 (分離比)	χ ² -検定値 *P<0.05	適合値
Cyn-主体型 と Dpn-主体型 (正逆交雑)	H ^T H ^F P _g P _g と H ^O H ^D P _g P _g	P _g nCynDpn	43	H ^O -P _g - と H ^T H ^D P _g -	3	2.869*	0.238
		CynDpn	44	H ^O -P _g P _g と H ^T H ^D P _g P _g	3		
		Dpn	40 (127)	H ^D H ^F -	2		
Dpn-主体型 と P _g n-主体型 (正逆交雑)	H ^O H ^D P _g P _g と H ^T H ^T P _g P _g	P _g nCynDpn	173 (173)	H ^O H ^T P _g P _g と H ^D H ^T P _g P _g	1	-	1.000
P _g n-主体型 と Cyn-主体型 (正逆交雑)	H ^T H ^T P _g P _g と H ^T H ^F P _g P _g	P _g nCynDpn	46	H ^T H ^F P _g -	1	0.011*	0.917
		P _g nCyn	47 (93)	H ^T H ^T P _g -	1		

【0033】

表1および表2から、Dpn-主体型品種はH^OH^DP_gP_g遺伝型であり、Cyn-主体型品種はH^TH^FP_gP_g遺伝型であり、P_gn-主体型品種はH^TH^TP_gP_g遺伝型であることを明らかにした。また、花色について、Dpn-主体型のH^OH^DP_gP_g遺伝型はCynDpn型であって、紫色であった。Cyn-主体型のH^TH^FP_gP_g遺伝型はP_gnCynDpn型であって、赤紫色であった。P_gn-主体型のH^TH^TP_gP_g遺伝型はP_gnCyn型であって、赤色であった。なお表1中none型は白花を示す。

【0034】

表1で得られた各F₂世代遺伝型を親株として、それらの自殖によるF₃世代の分離を調べ、各種F₂系統の色素型と遺伝型とを決定した。その結果を表3に示した。

【0035】

【表3】

P ₁ 世代 (F ₂ 系統)	P ₁ 世代 遺伝型	F ₃ アントシアニ ジンの色素型	観察値 (個体数)	F ₃ 世代 遺伝型	期待値 (分離比)	χ ² -検定値 *P<0.05	適合値
G2D3B27E	H ^T H ^F P _g P _g	CynDpn Cyn none (14)	8 4 2	H ^T H ^F P _g P _g H ^T H ^T P _g P _g H ^F H ^F P _g P _g	2 1 1	0.857*	0.651
G2D3B29A	H ^F H ^F P _g P _g	Pgn none (8)	6 2	H ^F H ^F P _g H ^F H ^F P _g P _g	3 1	0.000*	1.000
G2D3B25F	H ^F H ^F P _g P _g	Pgn (25)	25	H ^F H ^F P _g P _g	1	-	1.000
G2D3B27Y	H ^T H ^T P _g P _g	Cyn (6)	6	H ^T H ^T P _g P _g	1	-	1.000
G2D3B26B	H ^F H ^F P _g P _g	none (29)	29	H ^F H ^F P _g P _g	1	-	1.000
J5A2H16B	H ^O H ^O P _g P _g	CynDpn (10)	10	H ^O H ^O P _g P _g	1	-	1.000
J5A2H13CE	H ^O H ^D P _g P _g	CynDpn Dpn (36)	24 12	H ^O -P _g P _g H ^D H ^D P _g P _g	3 1	1.333*	0.248
J5A2H110C1A	H ^D H ^D P _g P _g	Dpn (10)	10	H ^D H ^D P _g P _g	1	-	1.000
W1C3B111Y	H ^T H ^T P _g P _g	PgnCyn (33)	33	H ^T H ^T P _g P _g	1	-	1.000

【0036】

表3から分かるように、H^FH^FP_gP_g遺伝型からPgn色素のみを有する色素型として、G2D3B25F系統（白色、白赤色、クリーム色、またはピンク色の花）を得た。H^TH^TP_gP_g遺伝型からCyn色素のみを有する色素型として、G2D3B27Y系統（白赤色、またはピンク色の花）を得た。H^FH^FP_gP_g遺伝型から色素を全く有しないnone型として、G2D3B26B系統（白花）を得た。H^OH^OP_gP_g遺伝型からCynDpn色素を有する色素型として、J5A2H16B系統（赤紫色の花）を得た。H^DH^DP_gP_g遺伝型からDpn色素のみを有する色素型として、J5A2H110C1A系統（紫色の花）を得た。H^TH^TP_gP_g遺伝型からPgnCyn色素を有する色素型として、W1C3B111Y系統（赤色の花）を得た。これらは、いずれも純系（優性または劣性のホモ型）であることは明らかである。

【0037】

【実施例2】

以下、F₁ 種子の交配作出法を具体的に説明する。

【0038】

Cyn型の一重全色ピンク色の花（H^TH^TP_gP_g遺伝型、ホモ型）とPgn型の一重全色白色の花（H^FH^FP_gP_g遺伝型、ホモ型）を交配し、PgnCynDpn型の一重全色赤紫色の花（H^TH^FP_gP_g遺伝型、ヘテロ型）を得た。

【0039】

CynDpn型の一重全色赤紫色の花（H^OH^OP_gP_g遺伝型、ホモ型）とPgn型の

一重全色白色の花 ($H^F H^F P g P g$ 遺伝型、ホモ型) を交配し、 $P g n C y n D p n$ 型の一重全色赤紫中間色の花 ($H^O H^F P g p g$ 遺伝型、ヘテロ型) を得た。

【0040】

$P g n C y n$ 型の一重全色赤色の花 ($H^T H^T P g P g$ 遺伝型、ホモ型) と $P g n$ 型の一重全色白色の花 ($H^F H^F P g P g$ 遺伝型、ホモ型) を交配し、 $P g n C y n D p n$ 型の一重全色ピンク中間色の花 ($H^T H^F P g p g$ 遺伝型、ヘテロ型) を得た。

【0041】

【比較例1】

遺伝子型を想定した方法(非特許文献6、小林加奈:育種学雑誌、48:169-176、1998)を用いて、 $P g n$ 型で白赤色の花と $C y n$ 型で白赤色の花を正逆交雑したところ、 $P g n C y n$ 型の赤紫色の花は得られず、その代わりに $P g n C y n D p n$ 型の赤紫色の花が得られた。非特許文献6の方法を用いた場合には、 $P g n C y n D p n$ 型の赤紫色の花が分離したことは説明が付かない。

【0042】

【比較例2】

遺伝子型を想定した方法(非特許文献6、小林加奈:育種学雑誌、48:169-176、1998)を用いて、 $P g n C y n$ 型で赤色の花と白花を正逆交雑したところ、 $P g n C y n$ 型で赤色の花は得られず、その代わりに $P g n C y n D p n$ 型の赤紫色の花が得られた。非特許文献6の方法を用いた場合には、 $P g n C y n D p n$ 型の赤紫色の花が分離したことは説明が付かない。

【0043】

これらの実施例から、本発明の遺伝型 $H^X H^X \cdot P g / p g$ で $P g n$ 、 $C y n$ 、 $D p n$ の色素型を帰属した花色育種法が優れた花色遺伝型交配法であることは明らかである。

【0044】

【発明の効果】

本発明により、トルコギキョウの花色遺伝型と色素遺伝型を明らかにできる。たとえば、花色遺伝型 $H^X H^X \cdot P g / p g$ であって $P g n$ 、 $C y n$ 、 $D p n$ の色素型を帰属した花色交配法を用いて、優れた新花色を提供できる。

また、他の花卉についても、花色遺伝型により優れた新花色を提供できる。従って、トルコギキョウを初めとする花卉の新花色作出について実用的な遺伝型交配法を提供するものである。